Per Omaggio

ESTRATTO

— DAL

Monitore Zoologico Italiano

Anno XLV, N. 3-4. — Firenze 1934

Prof. G. VERCELLANA.

Ricerche sulla morfologia del nucleo nelle cellule coltivate « in vitro » con particolare riguardo della cromatina.

(Con Tav. III-IV-V e 3 grafici fuori testo).

17

640

DITTA EDITRICE LUIGI NICCOLAI

FIRENZE

1934

Estratto dal Vol. XLV, fasc. 3-4, del *Mon. Zool. Ital.*

ISTITUTO DI ISTOLOGIA E FISIOLOGIA GENERALE DELLA R. UNIVERSITÀ
DI BOLOGNA DIRETTO DAL PROF. O. M. OLIVO.

Ricerche sulla morfologia del nucleo nelle cellule coltivate « in vitro » con particolare riguardo della cromatina.

(Con Tav. III-IV-V e 3 grafici fuori testo).

Del Prof. G. VERCELLANA.

Incaricato di Batteriologia ed Aiuto all'Istituto di Patologia Generale e Batteriologia della R. Università di Parma, diretto dal Prof. A. MARRASSINI.

È vietata la riproduzione.

La tecnica delle colture « in vitro », istituita da HARRISON, BURROWS e CARREL, ha consentito in questi ultimi venti anni di eseguire minute ed importanti indagini citologiche sui tessuti viventi. Questo metodo è stato utilizzato specialmente per lo studio della struttura fondamentale del citoplasma e con esso importanti dati di fatto, che non è il caso qui di ricordare, sono stati dimostrati particolarmente dai LEWIS (1), G. LEVI (2), CARREL ed EBELING (3), LAMBERT ed HANES (4), POLICARD e MANGENOT (5), STRANGEWAYS (6), ecc.

Sono relativamente poco numerose, invece, le osservazioni fatte sulla intima struttura del nucleo. Gli AA. che si sono occupati della struttura delle cellule coltivate « in vitro » si sono limitati a dare una descrizione generica dei nuclei esaminati a fresco, in campo oscuro, e nei preparati colorati coi metodi comuni. STRANGEWAYS per primo ha descritto le modificazioni morfologiche vitali dei nucleoli, LUDFORD (7) ha illustrata la possibilità di scambi materiali fra nucleo e citoplasma e SAGUCHI (8), più recentemente, ha descritto strutture particolari del nucleo, la presenza, tra l'altro, di un apparato chiamato *Centronefelio*, strutture particolari che non risultano essere state finora confermate.

Collo scopo specialmente di vedere se nella cellula coltivata « in vitro » si possa rilevare un qualche particolare inerente ai suoi costituenti nucleari che la differenzino o meno dalla cellula normale dei tessuti e per affrontare il problema già affacciato nel 1917-18 da

G. Levi sulla genesi dei cromosomi dalla sostanza apparentemente omogenea del nucleo in riposo, mi è parso utile ed interessante intraprendere una serie di ricerche, ricorrendo anche ai metodi elettivi di colorazione per la cromatina, data la difficoltà dell'esame a fresco del nucleo. Inoltre ho voluto esperimentare l'azione della temperatura e l'azione di alcuni agenti chimici sulla morfologia della cromatina e l'azione della temperatura sulla grandezza cellulare e nucleare.

Mi sono valso di cuore, pelle, muscoli e connettivo degli arti, prelevati da embrioni di pollo tra il 5° e l'8° giorno di incubazione e da embrioni di cavia lunghi da 10 a 35 mm. circa.

Ho allestito colture in goccia pendente secondo il metodo di Carrel, su vetro o su mica, mescolando in parti uguali plasma di pollo ed estratto embrionale di pollo. Con materiale di cavia solo pochi esperimenti furono fatti in plasma ed estratto embrionale omologhi, avendo per lo più usato plasma ed estratto embrionale di pollo.

Dopo 24-48-72 ore di permanenza a 37° C., le colture viventi venivano esaminate regolarmente a luce trasmessa ed in singoli casi in campo oscuro e poi fissate in sublimato saturo o Zenker-acetico per essere sottoposte rispettivamente alla colorazione coi metodi di Biondi-Heidenhain (ritenuto elettivo per la cromatina) e di Feulgen (elettivo per l'acido timonucleinico). Col metodo di Biondi-Heidenhain, come si sa, la cromatina dei nuclei in riposo ed i cromosomi vengono colorati elettivamente dal verde di metile. Il principio del metodo di Feulgen si fonda, invece, sopra il distacco, mediante una preliminare debole idrolisi acida, dei corpi purinici dal legame dell'acido nucleinico, per cui vengono liberati gruppi aldeidici riducenti che si legano coll'acido fucsinsolforoso, assumendo un'intensa colorazione rosso-violetta; questa reazione permette quindi di riconoscere l'acido timonucleinico. Siccome nel protoplasma non sono presenti gruppi aldeidici, detta colorazione si limita elettivamente al nucleo, nel quale soltanto la cromatina reagisce positivamente, venendo ad essere così dimostrata in modo specifico.

Per studiare l'azione della temperatura sul nucleo, le varie colture, trascorsi i suddetti periodi di tempo, erano suddivise in tre serie: una serviva da controllo (37° C.), un'altra era posta in frigorifero a + 5° C. e l'ultima in una stufa da paraffina a 43°-47° C. Il tempo di soggiorno delle colture a + 5° C. ed a 43°-47° C. oscillò fra 30 e 2 ore circa. Per constatare poi l'influenza della temperatura sulla grandezza cellulare e nucleare, colture tenute alla temperatura normale di 37° C. vennero confrontate con altre tenute rispettivamente a 16°-21° C. per 24 ore ed a 43° C. per 10 ore e fissate poi tutte contemporaneamente.

Ho sempre utilizzata la prima semina, perchè, come è noto, le cellule migrate già in essa hanno quella attività proliferativa e quei caratteri morfologici che si conservano poi indefinitamente nei successivi trapianti. [Carrel (9), A. Fischer (10), Olivo e De Lorenzi (11)].

Di tutti i tessuti coltivati ho preso in considerazione specialmente i fibroblasti.

Nel tessuto normale di embrione di pollo i nuclei, di forma ovalare, colorati col metodo di Biondi-Heidenhain, presentano una tinta verde pallida diffusa a tutto il nucleo; qualche volta le parti colorate in verde appaiono indistintamente granulose. Si notano inoltre 1-2 grossi nucleoli che si colorano colla fucsina e molto scarsi granuli acidofili (ossicromatina) (fig. 1).

In coltura, come si sa dalle descrizioni di varî AA., le cellule vanno soggette ad un appiattimento enorme, come io stesso ho potuto convincermi mediante le misurazioni sulle quali riferirò in seguito. All'esame a fresco i nuclei appaiono circondati da un sottilissimo anello di contorno, nel loro interno spiccano nettamente i nucleoli, nei quali ho notato movimenti ameboidi, come già, oltre a Strangeways, G. Levi e Ludford hanno rilevato. Oltre a questi costituenti, solo di rado si vede qualche zolletta di sostanze più rifrangenti che probabilmente sono piccole zolle di cromatina. Tutto il resto appare perfettamente omogeneo e trasparente. In campo oscuro i nuclei risultano di solito otticamente vuoti e si scorgono unicamente i contorni dei nucleoli; talvolta hanno, invece, un aspetto nebuloso.

Col metodo di Biondi-Heidenhain i nucleoli sono costantemente colorati in rosso (*nucleoli plastinici*), mentre il resto del contenuto nucleare presenta una tinta verde debolissima, spesso appena apprezzabile (fig. 3); si nota qualche raro granulo di ossicromatina. Col metodo di Feulgen si rileva che i nuclei sono colorati diffusamente in violetto piuttosto pallido; la tinta però non è perfettamente omogenea, ma come distribuita a piccole nubecole indistinte; inoltre vi è qualche piccolo granulo più intensamente colorato (fig. 14). In complesso si direbbe che la sostanza che si lega coll'acido fucsinsolforoso si trovi nel nucleo in quantità maggiore di quella che si colora elettivamente col verde di metile della miscela del Biondi. La sede dei nucleoli appare sempre come un vacuolo scolorato.

Se ci chiediamo la ragione della scarsissima colorabilità in verde col metodo di Biondi-Heidenhain dei nuclei in riposo delle cellule coltivate, si prospettano due eventualità: o che si tratti di una diluizione della cromatina per imbibizione del nucleo, oppure che si tratti di un assottigliamento del nucleo. È vero che è stato ammesso da G. Levi

ed altri AA. che il nucleo delle cellule coltivate « in vitro » aumenti di volume per assunzione di acqua, ma per poterlo affermare in modo sicuro bisognerebbe avere la possibilità di misurare il volume dei nuclei, ciò che tecnicamente è molto difficile ed io non oserei pronunciarmi in proposito. Quello che è certo però è che i nuclei sono enormemente assottigliati: lo spostamento di 1 μ della vite micrometrica nei preparati fissati è sufficiente, infatti, a metter fuori fuoco nelle due direzioni il nucleo; perciò l'aspetto particolarmente pallido di tali nuclei è da imputarsi di sicuro al loro piccolissimo spessore. Concorda con ciò anche il fatto che esaminando le colture a medio ingrandimento si osserva che l'intensità di colorazione dei nuclei è inversamente proporzionale alla loro area di proiezione: i nuclei più piccoli sono più intensamente colorati perchè meno espansi in superficie. Anche in queste condizioni di assottigliamento, il nucleo conserva una colorabilità diffusa, omogenea, il che coincide coll'osservazione in campo oscuro e fa concludere che la cromatina nei nuclei in riposo dei fibroblasti di embrione di pollo coltivati « in vitro » è distribuita omogeneamente. (*)

Sempre a proposito delle colture di embrione di pollo, debbo aggiungere che non si riesce a sorprendere il momento del passaggio dallo stato diffuso della cromatina a quello della sua concentrazione nei cromosomi delle cellule in mitosi. Nelle profasi esaminate nei preparati colorati coi metodi di Biondi-Heidenhain e di Feulgen si osserva la comparsa graduale di anse cromatiche, a colorabilità sempre più accentuata, rispettivamente verde e rosso-violetta, avvicinandosi alla metafase. Queste anse appaiono a volte omogenee e qualche volta finemente granulose (fig. 3-14). Quando si è giunti alla metafase, i cromosomi si colorano intensamente in verde col metodo di Biondi-Heidenhain. Tale loro forte colorabilità non può essere interpretata come un semplice addensamento della cromatina prima diffusa a tutto il nucleo, perchè le parti di materiale colorate in verde sono quantitativamente ed in misura assoluta aumentate di molto. Col metodo di Feulgen, invece, si ha l'impressione che l'acido timonucleinico (quello che dà la reazione colorata), prima diffuso in tutto il nucleo, si sia concentrato nei cromosomi. Le lievi differenze constatate fra il metodo di Biondi-Heidenhain e quello di Feulgen, provengono evidentemente dal fatto che il primo colora la basicromatina (legame dell'acido timonucleinico con basi proteiche) ed il secondo dà una reazione colorata proporzionale alla quantità di acido timonucleinico. È

(*) Quando parlo di omogeneità mi riferisco soltanto alla omogeneità ottica.

quindi molto attendibile l'ipotesi di HEIDENHAIN, secondo la quale durante la profase si avrebbero delle modificazioni chimiche nel materiale cromatinico, per cui l'acido nucleinico si legherebbe a quantità diverse di basi proteiche e modificherebbe così la sua colorabilità di fronte alla miscela del Biondi.

Nelle cellule in cariocinesi, inoltre, gli scarsi granuli di ossicromatina ed i nucleoli, presenti nei nuclei in riposo, si dissolvono senza lasciare alcuna traccia di sè. È possibile che essi si trasformino in basicromatina secondo l'ipotesi di HEIDENHAIN, però non ho alcun elemento sicuramente probativo in proposito. Recentemente SAGUCHI ha sostenuto l'origine dei cromosomi e financo del condrioma dai nucleoli. Io mi sono fatto il convincimento che ciò non si possa sostenere: per l'origine del condrioma ritengo superflua la discussione dati i concordi risultati dei più autorevoli citologi e per l'origine dei cromosomi è sufficiente la semplice constatazione che durante la profase essi si abbozzano simultaneamente in tutta l'area nucleare prima che sia scomparso il nucleolo, e non possono quindi derivare da questo.

In conclusione da queste osservazioni non si riesce a rilevare nessun particolare preciso sul meccanismo di formazione dei cromosomi.

Per ciò che si riferisce all'embrione di cavia, si nota costantemente una maggior quantità di piccole zolle e granuli di basicromatina, mescolati a granuli di ossicromatina, tanto nei nuclei del tessuto normale, quanto in quelli delle cellule coltivate « in vitro ». Anche qui, come si è già detto per l'embrione di pollo, le cellule coltivate sono molto espanse in superficie ed i nuclei fortemente assottigliati e dilatati. Questi, in campo oscuro, appaiono per lo più un po' nebulosi, presentano quasi una nebulosità reticolare. L'intima architettura però dei costituenti del nucleo, quale la si riscontra coi metodi di Biondi-Heidenhain e di Feulgen, non risulta modificata rispetto a quella dei nuclei del corrispondente tessuto normale (fig. 2-6-17).

Nelle cellule in mitosi di embrione di cavia si assiste alla comparsa, durante la profase, di anse cromatiche che si colorano molto intensamente in verde col metodo di Biondi-Heidenhain ed in rosso-violetto con quello di Feulgen: si ha come l'impressione di una agglutinazione, di un concentramento dei granuli e delle zollette di basicromatina prima sparsi nel nucleo (fig. 6-7-8-17-18).

Le differenze riscontrate fra l'embrione di pollo e quello di cavia nella quantità e nella distribuzione della cromatina sia dei nuclei in riposo, sia di quelli in mitosi, sono differenze di specie già note da tempo. È di un certo interesse però rilevare come queste differenze persistano nelle condizioni di coltura « in vitro », dato morfologico questo che è perfettamente in accordo col dato fisiologico, dimostrato

fra l'altro da A. Fischer, della persistenza nelle colture « in vitro » della specificità di specie.

L'esame a fresco delle colture di embrioni di pollo e di cavia sottoposte all'azione del freddo (+ 5° C.) non consente di rilevare alcuna differenza citologica rispetto alle cellule tenute costantemente a 37° C. Probabilmente le modificazioni indotte dall'abbassamento di temperatura non sono dell'ordine di grandezza microscopica. Queste colture sopravvivono, com'è noto, anche dopo soggiorno prolungato alle basse temperature; io non sono riuscito a vedere delle mitosi subito dopo interrotta l'azione della temperatura bassa.

Per la sopravvivenza delle colture « in vitro » alle alte temperature posso confermare i dati del Bucciante (12) per l'embrione di pollo: le cellule sopravvivono costantemente dopo esposte da 30' a 2 ore a 43°-45° C. ed alcune sopravvivono anche dopo essere state tenute a 46°-47° C.

Per la cavia posso confermare quanto Lambert e Hanes hanno rilevato per i topi ed i ratti, e cioè che il limite di temperatura al quale sopravvivono le cellule dei mammiferi è di 3°-4° C. inferiore a quello del pollo, il che starebbe in rapporto colla temperatura corporea più elevata negli uccelli che nei mammiferi. Nelle cellule delle colture « in vitro » esposte a temperature elevate ed esaminate a fresco non mi fu dato però di constatare con certezza delle mitosi ed ho giudicato sulla sopravvivenza di alcuni elementi cellulari basandomi su qualche movimento ameboide e quindi su qualche modificazione di forma di essi, tenuti per un po' di tempo sotto osservazione.

A 43°-45° C. i nuclei in riposo appaiono pressochè omogenei, il citoplasma presenta un certo numero di granuli rifrangenti ed in qualche cellula è vacuolizzato. Anche a 46°-47° C. il citoplasma di alcune cellule è abbastanza trasparente, ma in qualche altra è vacuolizzato e provvisto di numerose gocciole, che, com'è noto, sono di grasso, situate specialmente ai poli della cellula; i nuclei in riposo permangono anch'essi per lo più abbastanza trasparenti; altre volte il citoplasma si fa finemente granuloso ed anche il nucleo diventa opaco e spesso picnotico. Probabilmente si è arrivati in questi ultimi casi ad una coagulazione da calore.

Coi metodi di Biondi-Heidenhain e di Feulgen, i nuclei in riposo delle cellule di embrioni di pollo e di cavia coltivate « in vitro » e sottoposte all'azione del freddo (+ 5° C.) si presentano, presso a poco, coll'aspetto di quelli delle colture normali (fig. 4-8 bis-15-19).

In seguito al trattamento delle colture di embrioni di pollo e di cavia con le alte temperature (43°-47° C.), invece, nelle cellule si constatano delle modificazioni degne di nota rispetto alla norma.

Prescindendo dalle vacuolizzazioni del citoplasma e dalle modificazioni di forma che le cellule possono subìre, dico subito che i nuclei in riposo si presentano di un colorito rossiccio con granuli o chiazze o bastoncelli verdi sparsi qua e là nel materiale di cavia e con ben evidenti nucleoli tinti in rosso nel materiale di pollo, se colorati col metodo di Biondi-Heidenhain (fig. 5-9-10); di un colorito omogeneamente violaceo con qualche granulo più intensamente colorato e qualche vacuolo, invece, se trattati col metodo di Feulgen. In questi ultimi preparati i nucleoli sono scolorati e si presentano come grosse aree vuote (fig. 16-20).

All'esame a fresco delle colture di embrioni di pollo e di cavia tenute a basse o ad alte temperature non mi fu dato di osservare con certezza delle mitosi, come ho già riferito.

I cromosomi delle cellule in mitosi delle colture « in vitro » di embrioni di pollo e di cavia tenute a + 5° C. e colorate coi metodi Biondi-Heidenhain e di Feulgen non manifestarono rimarchevoli modificazioni nella loro forma, distribuzione e colorabilità in confronto a quelli delle cellule in cariocinesi delle colture normali; alcune volte però ho notato una tinta rispettivamente verde e rosso-violetta più pallida dei cromosomi stessi (fig. 4-8 bis-15-19). In queste colture non si è verificato il fenomeno osservato da O. Hertwig (13) concernente i cromosomi di uova di echinodermi dopo un raffreddamento di 2 ore e cioè un rigonfiamento, un addossamento reciproco, talvolta una fusione di tali cromosomi in masse compatte ed irregolari.

Invece, nelle colture di embrioni di pollo e di cavia, sottoposte all'azione di temperature fra i 43° C. ed i 47° C. e colorate coi metodi di Biondi-Heidenhain e di Feulgen, i singoli cromosomi spesso non si vedono più distinti, perchè si conglutinano, si fondono in una o due masse più o meno grandi, compatte ed irregolari, colorate rispettivamente in verde intenso, talvolta quasi nere, oppure in rosso-violetto (fig. 5-9-10-16-20).

A questo proposito è opportuno ricordare che già il Bucciante, esaminando a fresco, a luce trasmessa, delle colture di embrione di pollo tenute a 46°-47° C., collo scopo di studiare l'influenza della temperatura sulla velocità della mitosi, aveva visto, tra l'altro, che i cromosomi, fortemente rifrangenti, si confondevano in una o due masse grossolane, a seconda dello stadio della mitosi.

È degno di nota poi il fatto che il calore determina nei cromosomi delle cellule in mitosi coltivate « in vitro » un fenomeno analogo a quello osservato da O. Hertwig nelle uova di echinodermi in seguito all'azione del freddo.

Ho cercato anche di valutare l'azione della temperatura sulla grandezza cellulare e dei nuclei.

Tralascio di ricordare tutta la ricca bibliografia in proposito, opera specialmente di R. Hertwig (14) e della sua Scuola. L'argomento fu particolarmente sviluppato da G. Levi (15) nel 1906 ed al suo lavoro si rimanda per la bibliografia precedente. Nelle colture « in vitro » l'indice nucleo-plasmatico fu determinato dal Dogliotti (16).

Le colture di cuore embrionale di pollo al 7° giorno di incubazione, da me utilizzate a questo scopo, vennero fissate e colorate col metodo di Biondi-Heidenhain. Ad un ingrandimento di 1000 diametri furono disegnate su carta millimetrata, mediante l'uso della camera lucida, 50 cellule di colture sviluppate a 37° C., 52 cellule di colture tenute a 43° C., 54 cellule di colture tenute a 16°-21° C. (tutte scelte a caso fra le più periferiche e lamellari di ogni singolo espianto) e 54 cellule riprodotte da sezioni microtomiche di cuore embrionale di pollo al 7° giorno di incubazione e non coltivato. Dai disegni ho letto direttamente in mm.^{2} l'area delle cellule e dei rispettivi nuclei, valori corrispondenti in μ^2 alle aree reali delle cellule. È ovvio che le superfici reali rispettivamente delle cellule e dei nuclei sono per lo meno il doppio delle aree di proiezione, considerando piane le superfici e trascurando l'ampiezza dei margini.

Per determinare l'indice nucleo-plasmatico, bisognerebbe valutare il volume del citoplasma e del nucleo, ma ciò è praticamente impossibile, perchè non solo è difficilissimo apprezzare lo spessore del citoplasma, ma questo spessore è anche non uniforme, decrescendo verso i margini della cellula. È vero che Policard (17) ha suggerito un metodo indiretto per determinare, almeno approssimativamente, lo spessore delle lamine protoplasmatiche delle cellule coltivate « in vitro », ma questo metodo non ci può servire perchè parte dal presupposto che il volume delle cellule « in vitro » rimanga eguale a quello delle cellule dei tessuti e quindi che sia conosciuto, mentre invece è proprio questa l'incognita che si dovrebbe calcolare. Dogliotti si è attenuto al criterio del Levi, di utilizzare cioè come equivalenti dei volumi le aree di proiezione delle cellule e dei nuclei. Questo modo di procedere potrebbe essere giustificato fino ad un certo punto per le cellule coltivate « in vitro » se si potesse dimostrare che lo spessore di tali cellule è uniforme e che in corrispondenza dell'area di proiezione nucleare il citoplasma è ridotto ad una quantità trascurabile. Però i dati così ottenuti non si potrebbero confrontare coi valori che si hanno nelle cellule in seno ai tessuti normali, perchè in quest'ultimo caso, per la forma sferica o poliedrica delle cellule, le aree di proiezione del nucleo e della cellula non sarebbero più proporzionali ai loro volumi.

Per queste considerazioni io ho preferito limitarmi, nel confronto fra le cellule del tessuto non coltivato e le cellule coltivate « in vitro » a varie temperature, a considerare soltanto i valori assoluti ed i relativi rapporti fra sviluppo di superficie cellulare e sviluppo di superficie nucleare. Anche questi dati non sono certamente privi d'interesse, perchè lo sviluppo di superficie è generalmente proporzionale all'entità degli scambi fra citoplasma ed ambiente e fra nucleo e citoplasma.

Per le cellule coltivate « in vitro » ho calcolato anche l'indice nucleo-plasmatico medio col criterio adottato da Levi e Dogliotti, secondo la formula:

$$\text{indice nucleo-plasmatico} = \frac{\text{area nucleare} \times 100}{\text{area cellulare - area nucleare}}$$

Riporto ora i dati medî ottenuti per ogni gruppo di elementi cellulari misurati:

	Tessuto normale	*Colture a:*		
		16° - 21° C.	37° C.	43° C.
Area del citoplasma: μ^2	19 31	353,11	344,29	390,36
Area del nucleo: μ^2	9,68	56,75	65,22	68,76
Rapporto di superficie nucleo-plasmatico:	50,12	16,07	19,74	17,61
Indice nucleo-plasmatico:	(100,51)	19,14	23,37	21,38

Da questi dati si desume, oltre alla nota enorme maggior grandezza della superficie del citoplasma e del nucleo delle cellule coltivate « in vitro », rispetto a quelle non coltivate, che alla temperatura di 43° C. l'area media del citoplasma e del nucleo è maggiore in confronto a quella delle cellule coltivate a 37° C. e che alla temperatura di 16°-21° C., mentre la superficie media del citoplasma è pressochè uguale a quella delle cellule coltivate a 37° C., l'area media del nucleo è evidentemente minore (graf. 1-2). Inoltre il rapporto di superficie nucleo-plasmatico, che nelle colture a 37° C., rispetto al tessuto normale, diminuisce notevolmente, diventa più basso nelle cellule coltivate a 43° C. ed ancora minore in quelle coltivate a 16°-21° C. (graf. 3).

Col modificarsi della temperatura, adunque, il citoplasma si espande maggiormente passando da 37° C. a 43° C. ed aumenta di poco, o forse resta stazionario, passando da 37° C. a 16°-21° C.

Queste modificazioni nella estensione della superficie cellulare sono

certo in rapporto con una modificazione di tutte le costanti fisiche del mezzo di coltura e del citoplasma e probabilmente in rapporto, in special modo, con modificazioni della tensione superficiale. Purtroppo, per le ragioni sopra esposte, non abbiamo un criterio per valutare le modificazioni di volume del citoplasma stesso, come non siamo in grado di valutare le variazioni del volume dei nuclei, i quali, come già ho detto, passando dalle basse alle alte temperature, aumentano regolarmente la loro area di proiezione, aumento che può essere in parte passivo, dovuto cioè al differente grado di appiattimento del citoplasma.

Secondo i risultati concordi di ERDMANN (18), CHAMBERS (19), KÖHLER (20) e O. HARTMANN (21) il calore diminuisce la grandezza cellulare e nucleare, ma quest'ultima in misura maggiore, per cui il rapporto nucleo-plasmatico si sposta in favore del citoplasma. Ora, se nei miei risultati l'area del nucleo alle differenti temperature fosse costantemente proporzionale al volume del nucleo medesimo, si dovrebbe concludere per un comportamento di esso di fronte alle variazioni di temperatura opposto a quello riscontrato su molteplice materiale dagli AA. sopra citati. Però io non oso pronunciarmi in proposito finchè non mi sarà riuscito di determinare il volume reale dei nuclei. Non va dimenticato a questo riguardo che « in vitro » le cellule hanno i nuclei enormemente appiattiti e quindi piccole modificazioni del loro spessore possono indurre modificazioni del loro volume assai più rilevanti delle modificazioni delle aree di proiezione. Si può anzi prospettare la possibilità che qualora i nuclei delle cellule coltivate « in vitro » coll'abbassarsi della temperatura aumentino di volume, quest'aumento avvenga per assorbimento di liquido dal citoplasma, onde ne conseguirebbe la tendenza del nucleo ad assumere una forma sferica e quindi si avrebbe una diminuzione dell'area di proiezione di esso, dovuta al modificarsi della forma del nucleo.

Ho già accennato che ho saggiata anche l'influenza di alcuni agenti chimici sulla cromatina. Fra l'altro, per constatare se si poteva indurre qualche manifesta variazione nel contenuto in cromatina nei nuclei, ho esperimentata l'azione sulle colture « in vitro » dell'acido nucleinico secondo Hefe (Schuchardt) e dell'acido orto-fosforico (Erba). Sinora nei nuclei non ho rilevata nessuna apprezzabile modificazione nel tenore in cromatina; ho notato, invece, in modo chiarissimo la comparsa e la conservazione nelle colture (trattate con detti acidi e poi fissate e colorate col metodo di Biondi-Heidenhain) del fuso acromatico, dei centrioli e delle radiazioni intorno a questi (fig. 11-12-13).

Si tratta molto probabilmente non di un'azione specifica delle due suddette sostanze, ma di un'azione generica degli acidi, tanto è vero che un aspetto consimile delle cellule in cariocinesi, sebbene però non

così netto e preciso, si ottiene anche con altri acidi, per esempio con l'acido formico e l'acido acetico. Per il momento non si può però affermare se è in giuoco un'azione biologica della cellula viva, oppure, più semplicemente, una particolare azione fissatrice delle menzionate sostanze.

* * *

In base al suesposto credo di poter addivenire alle seguenti conclusioni.

1) Nei tessuti coltivati « in vitro » tanto di pollo, quanto di cavia la cromatina dei nuclei in riposo non risulta aumentata rispetto a quella dei corrispondenti tessuti normali, ad onta del costante elevato potere proliferativo mantenuto da queste cellule.

2) Durante il processo mitotico la basicromatina, colorabile col verde di metile secondo il metodo di Biondi-Heidenhain, è tutta concentrata nei cromosomi e, almeno nel pollo, quantitativamente aumentata rispetto a quella delle cellule in riposo.

L'acido timonucleinico, invece, dimostrato col metodo di Feulgen, sembra quantitativamente eguale nel nucleo in riposo ed in quello in mitosi degli embrioni di pollo e di cavia.

3) Le basse temperature (+ 5° C.) non modificano sensibilmente i caratteri morfologici nè del nucleo in riposo, nè della parte cromatica della mitosi.

Le alte temperature (43°-47° C.), invece, determinano una distribuzione irregolare della cromatina dentro i nuclei in riposo ed una conglutinazione dei cromosomi durante la cariocinesi.

4) L'azione prolungata delle temperature inferiori alla normale determina un rimpicciolimento dell'area di proiezione del nucleo e non modifica molto l'espansione del citoplasma.

L'azione di temperature superiori alla norma determina un aumento dell'area di proiezione tanto nucleare che citoplasmatica.

Ringrazio molto sentitamente il Prof. Olivo per la gentile ospitalità concessami nel suo Istituto e per i consigli e l'aiuto che mi ha prodigati.

RIASSUNTO.

L'A. ha studiato nelle culture « in vitro » a 37° C. di embrioni di pollo e di cavia il comportamento della cromatina dei nuclei in riposo e delle cellule in mitosi e l'influenza esercitata su di essa dalle basse e dalle alte temperature, mettendo in evidenza le modificazioni e le alterazioni da queste provocate.

Inoltre ha studiato l'azione di varie temperature sulla grandezza delle cellule e dei loro nuclei.

SPIEGAZIONE DELLE FIGURE.

Tavola III e IV.

Figure 1-13.

Disegni eseguiti alla camera lucida ad un ingrandimento di 1000 diametri, ridotti a 2/3. Fissazione in sublimato saturo. Colorazione Biondi-Heidenhain.

Fig. 1. — Sezione microtomica di cuore normale di embrione di pollo al settimo giorno di incubazione.

Fig. 2. — Sezione microtomica di cuore normale di embrione di cavia di mm. 20.

Fig. 3. — Coltura *in vitro* di cuore di embrione di pollo al settimo giorno di incubazione (37° C.) colorata *in toto*.

Fig. 4. — Coltura *in vitro* di cuore di embrione di pollo al settimo giorno di incubazione tenuta a + 5° C. per circa un'ora prima della fissazione e colorata *in toto*.

Fig. 5. — Coltura *in vitro* di cuore di embrione di pollo al settimo giorno di incubazione tenuta a 43°-47° C. per circa un'ora prima della fissazione e colorata *in toto*.

Fig. 6. — Coltura *in vitro* di cuore di embrione di cavia di mm. 12 (37° C.) colorata *in toto*.

Fig. 7. — Coltura *in vitro* di cuore di embrione di cavia di mm. 12 (37° C.) colorata *in toto*.

Fig. 8. — Coltura *in vitro* di cuore di embrione di cavia di mm. 12 (37° C.) colorata *in toto*.

Fig. 8*bis*. — Coltura *in vitro* di cuore di embrione di cavia di mm. 12 tenuta a + 5° C. per circa un'ora prima della fissazione e colorata *in toto*.

Fig. 9. — Coltura *in vitro* di cuore di embrione di cavia di mm. 20 tenuta a 43°-47° C. per circa un'ora prima della fissazione e colorata *in toto*.

Fig. 10. — Coltura *in vitro* di tessuto connettivo degli arti di embrione di cavia di mm. 12 tenuta a 43°-47° C. per circa un'ora prima della fissazione e colorata *in toto*.

Fig. 11. — Coltura *in vitro* di cuore di embrione di pollo al sesto giorno di incubazione trattata coll'acido orto-fosforico prima della fissazione e colorata *in toto*.

Fig. 12. — Coltura *in vitro* di cuore di embrione di pollo al sesto giorno di incubazione trattata coll'acido orto-fosforico prima della fissazione e colorata *in toto*.

Fig. 13. — Coltura *in vitro* di cuore di embrione di pollo al settimo giorno di incubazione trattata coll'acido nucleinico (secondo Hefe) prima della fissazione e colorata *in toto*.

Tavola V.

Figure 14-20.

Disegni eseguiti alla camera lucida ad un ingrandimento di 1000 diametri, ridotti a 2/3. Fissazione in Zenker-acetico. Colorazione Feulgen.

Fig. 14. — Coltura *in vitro* di cuore di embrione di pollo al settimo giorno di incubazione (37° C.) colorata *in toto*.

Fig. 15. — Coltura *in vitro* di cuore di embrione di pollo al settimo giorno di incubazione tenuta a + 5° C. per circa un'ora prima della fissazione e colorata *in toto*.

Fig. 16. — Coltura *in vitro* di cuore di embrione di pollo al settimo giorno di incubazione tenuta a 43°-47° C. per circa un'ora prima della fissazione e colorata *in toto*.

Fig. 17. — Coltura *in vitro* di cuore di embrione di cavia di mm. 35 (37° C.) colorata *in toto*.

Fig. 18. — Coltura *in vitro* di cuore di embrione di cavia di mm. 35 (37° C.) colorata *in toto*.

Fig. 19. — Coltura *in vitro* di cuore di embrione di cavia di mm. 35 tenuta a + 5° C. per circa un'ora prima della fissazione e colorata *in toto*.

Fig. 20. — Coltura *in vitro* di cuore di embrione di cavia di mm. 35 tenuta a 43°-47° C. per circa un'ora prima della fissazione e colorata *in toto*.

SPIEGAZIONE DEI GRAFICI.

Graf. 1. — Rappresentazione grafica delle differenti grandezze dell'area di proiezione nucleare in fibroblasti embrionali di pollo al settimo giorno di incubazione osservate rispettivamente nel tessuto normale e nelle colture *in vitro* tenute prima della fissazione alle temperature indicate nel disegno. Per ogni gruppo di osservazioni le grandezze nucleari sono seriate in ordine di grandezza crescente.

Graf. 2. — Rappresentazione grafica delle differenti grandezze dell'area di proiezione cellulare in fibroblasti embrionali di pollo al settimo giorno di incubazione osservate rispettivamente nel tessuto normale e nelle colture *in vitro* tenute prima della fissazione alle temperature indicate nel disegno. Per ogni gruppo di osservazioni le grandezze cellulari sono seriate in ordine di grandezza crescente.

Graf. 3. — Rappresentazione grafica della grandezza dell'area cellulare in rapporto alla grandezza dell'area nucleare in fibroblasti embrionali di pollo al settimo giorno di incubazione. Punti pieni vicini all'origine dell'ascissa : valori dei fibroblasti del tessuto normale ; cerchietti neri : valori dei fibroblasti in coltura *in vitro* a 37° C. ; cerchietti rossi : valori dei fibroblasti in coltura *in vitro* sottoposti alla temperatura di 43° C. prima della fissazione ; cerchietti *bleu* : valori dei fibroblasti in coltura *in vitro* sottoposti alla temperatura di 16°-21° C. prima della fissazione. Le stelline rappresentano la media totale dei singoli gruppi di osservazioni.

BIBLIOGRAFIA.

1. Lewis M. R. a. W. H. — Mitochondria (and other cytoplasmic structures) in tissue cultures. — *American Journal of Anatomy, XVII (1914-1915), 339-401.*
2. Levi G. — Nuovi studî su cellule coltivate « in vitro ». — *Archivio Italiano di Anatomia e di Embriologia, XVI (1917-18), 4, 423-599.*
3. Carrel ed Ebeling. — Citati da Olivo O. M. (Struttura ed attività biologiche delle cellule coltivate in vitro. — *Bollettino della Società italiana di Biologia sperimentale, VIII [1933], 6, 1085-1131).*
4. Lambert R. A. u. Hanes F. M. — Beobachtungen an Gewebskulturen in vitro. — *Virchow's Archiv, CCXI (1913), 1, 89-116.*
5. Policard A. et Mangenot G. — Action de la température sur le chondriome cellulaire. Un critérium physique des formations mitochondriales. — *C. R. des Séances de l'Académie des Sciences, CLXXIV (1922), 645-647.*
6. Strangeways T. S. P. — Observations on the Changes seen in Living Cells during Growth and Division. — *Proceedings of the Royal Society, B, 94 (1923),*
7. Ludford R. J. — Nuclear Activity in Tissue Cultures. — *Proceedings of the Royal Society, B, 98 (1925), 457-467.*
8. Saguchi S. — Untersuchungen über die Wechselbeziehung zwischen Karyo- und Zytoplasma. 1. Zentronephelium und Chondriom, und ihre Beziehung zum Kern, nebst einem Beitrag zur Frage nach der Bedeutung der Nukleolen. Beobachtungen an den explantierten Geweben des Hühnerembryos. — *Zytologische Studien, 1927, I.*

   Saguchi S. — Ueber das Verhalten des Nukleolus bei der Mitose im Kulturgewebe, nebst Bemerkungen über die Chromosomenzahl beim Huhn. — *Zytologische Studien, 1930, III.*
9. Carrel A. — Present conditions of a two years old strain of connective tissue. — *Berlin, Klin. Wschr., 1914, 51, 509.*
10. Fischer A. — Gewebezüchtung. — *München, Mueller u. Steinicke, 1930.*
11. Olivo O. M. e De Lorenzi E. — Ricerche sulla velocità di accrescimento delle cellule e degli organi. — *Archiv für experimentelle Zellforschung, XIII (1932), 221-257.*
12. Bucciante L. — Ulteriori ricerche sulla velocità della mitosi nelle cellule coltivate *in vitro* in funzione della temperatura. — *Archiv für experimentelle Zellforschung, V (1927).*
13. Hertwig O. — *Allgemeine Biologie, 6 u 7. Auflage, Jena, Fischer, 1923.*
14. Hertwig R. — Ueber Korrelation von Zell-und Kerngrösse. — *Biol. Centralbl., 23 (1903).*
15. Levi G. — Studî sulla grandezza delle cellule. I. Ricerche comparative sulla grandezza delle cellule dei mammiferi. — *Archivio Italiano di Anatomia e di Embriologia, V (1906), 291-358.*
16. Dogliotti G. C. — L' indice nucleo-plasmatico nelle cellule coltivate *in vitro*. — *Archiv für experimentelle Zellforschung, III (1926), 242-249.*
17. Policard A. — Sur le degré d'épaisseur des lames protoplasmiques dans les cellules étalées des cultures *in vitro* d' histiocytes. Rapport avec les couches de Langmuir. — *C. R. des Séances de la Société de Biologie, XCIV (1926), 3, 197-198.*
18. Erdmann. — Citato da Hertwig O., l. c.
19. Chambers. — Citato da Hertwig O., l. c.
20. Köhler. — Citato da Hertwig O., l. c.
21. Hartmann O. — Citato da Hertwig O., l. c.

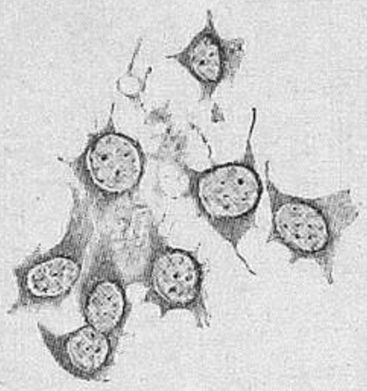

Fig. 1.

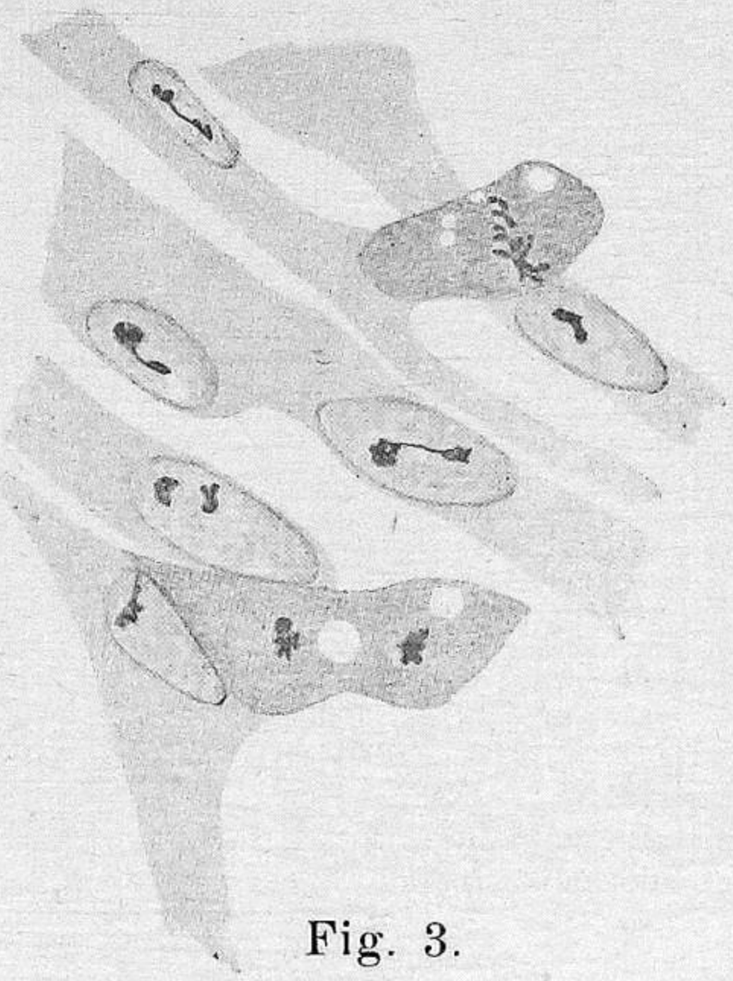

Fig. 3.

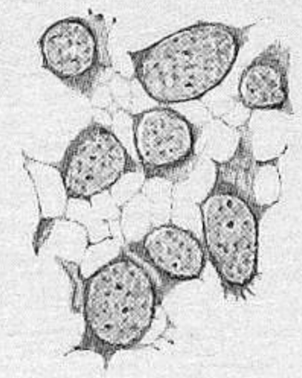

Fig. 2.

Fig. 4.

Fig. 5.

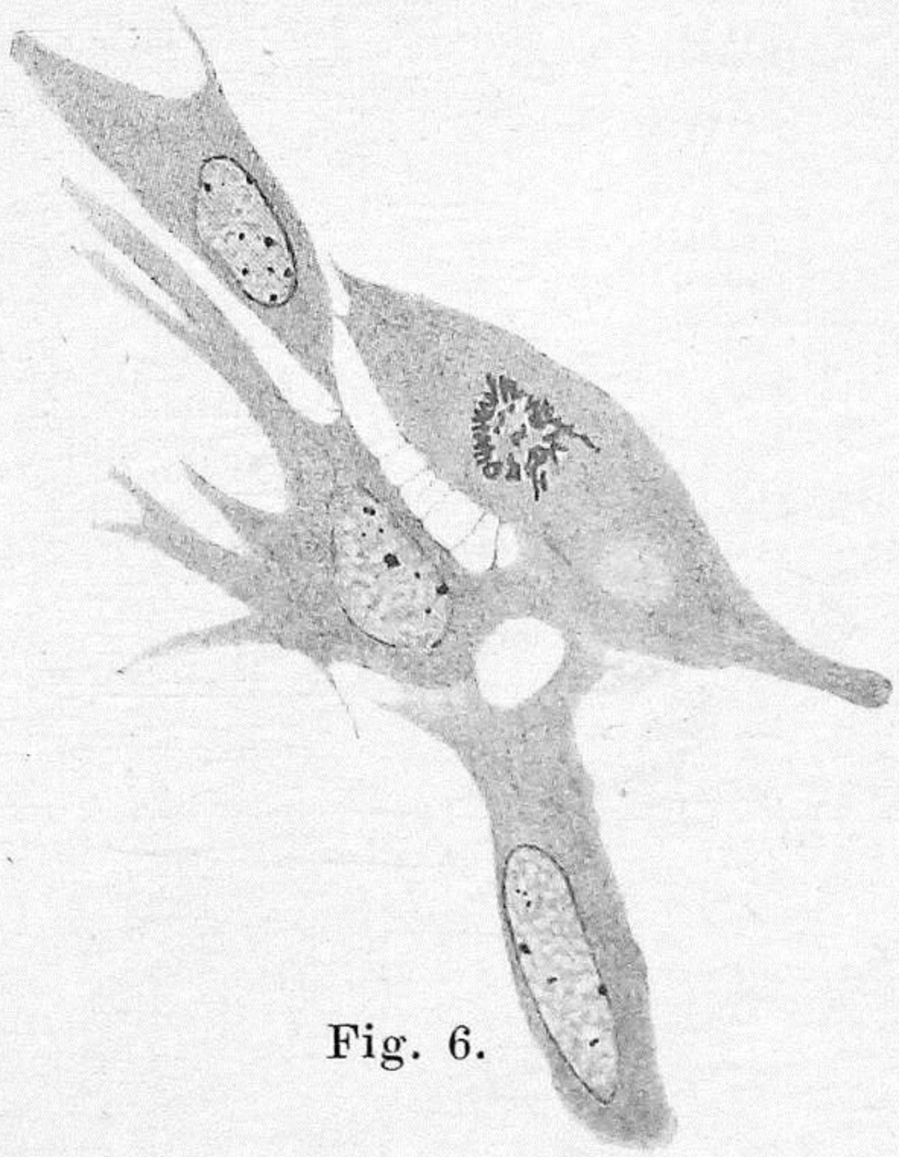

Fig. 6.

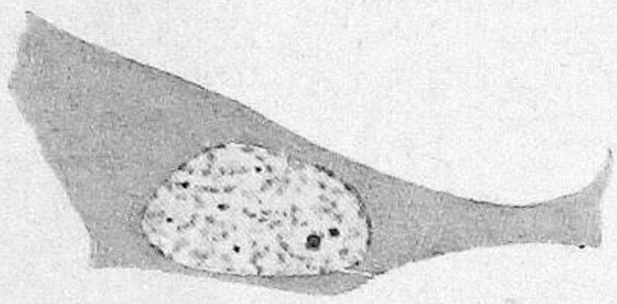

Fig. 7.

G. VERCELLANA. *Ricerche sulla morfologia del nucleo nelle cellule coltivate « in vitro » con particolare riguardo della cromatina.*

475-33-34 — Incisione e stampa ALFANI E VENTURI - FIRENZE

Fig. 8.

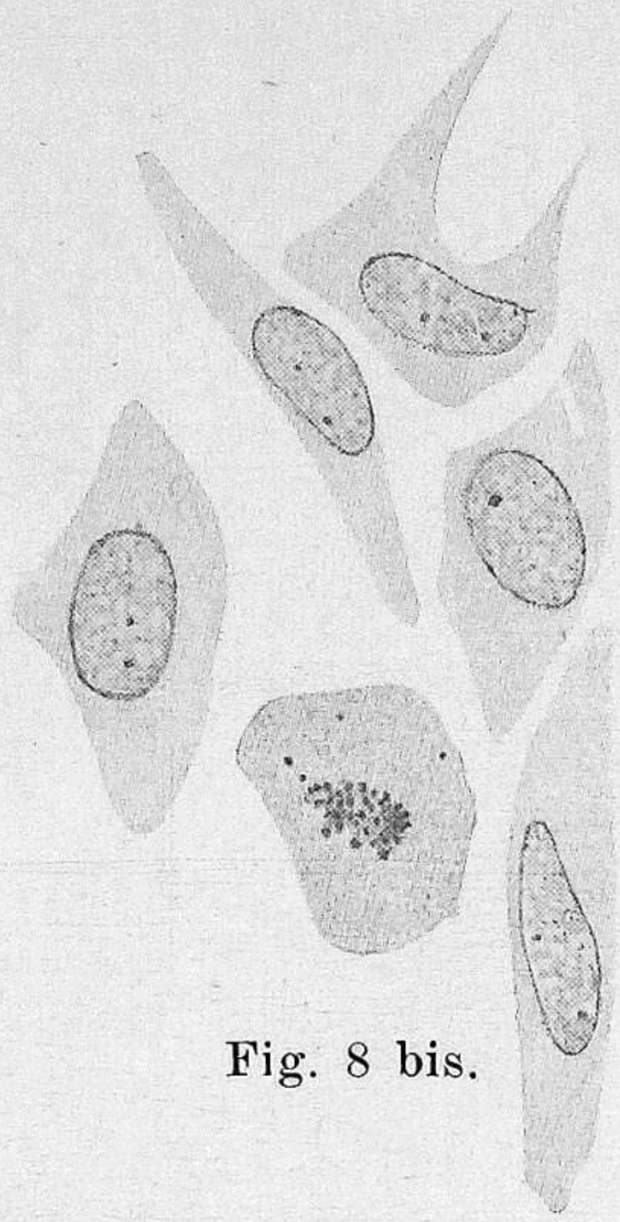

Fig. 8 bis.

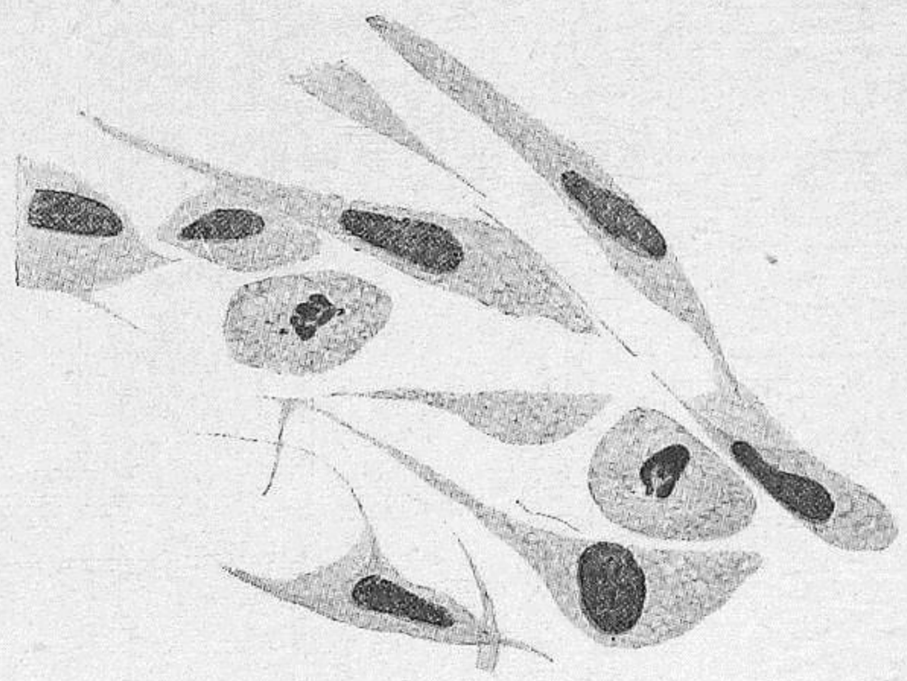

Fig. 9.

Fig. 10.

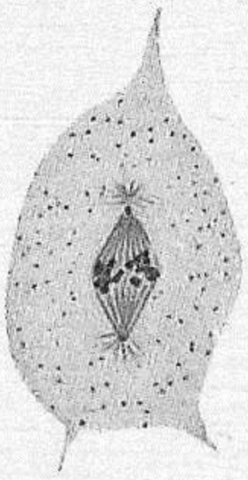

Fig. 11.

Fig. 12.

Fig. 13.

475-33-34 — Incisione e stampa ALFANI E VENTURI - FIRENZE

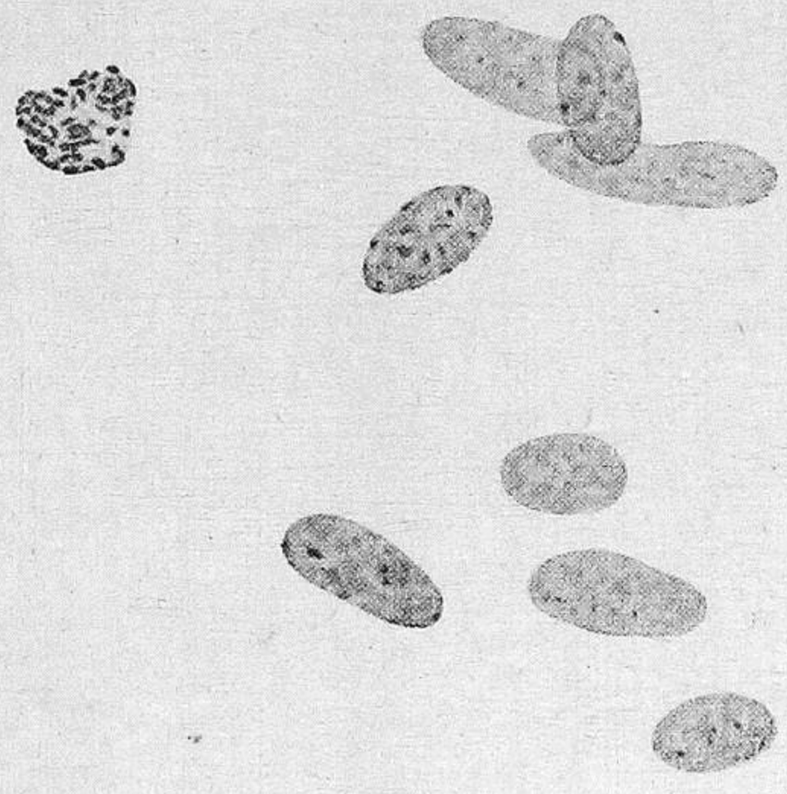

Fig. 19.

Fig. 16.

Fig. 15.

Fig. 14.

Fig. 20.

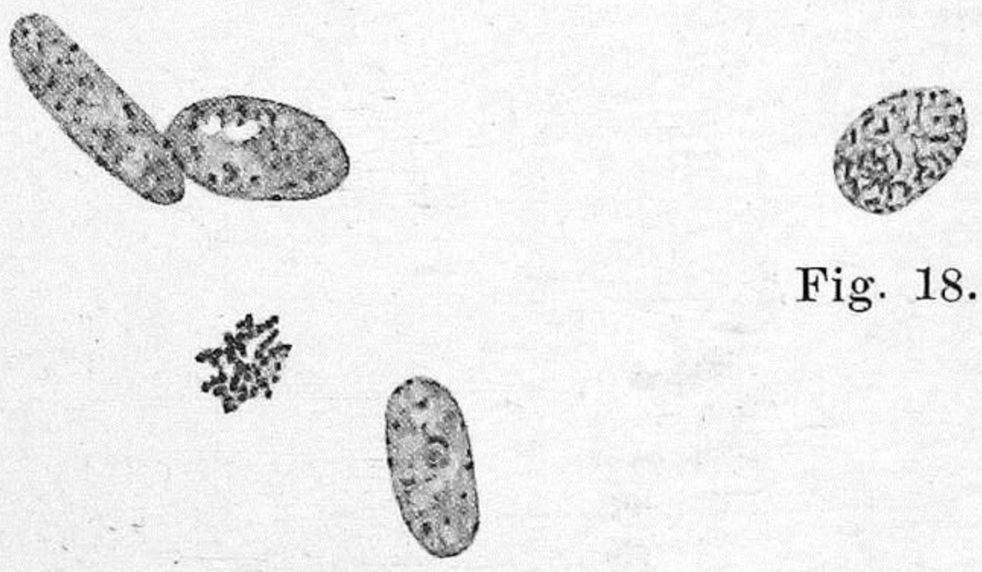

Fig. 18.

Fig. 17.

G. VERCELLANA. *Ricerche sulla morfologia del nucleo nelle cellule coltivate « in vitro » con particolare riguardo della cromatina.*

475-33 34 — Incisione e stampa ALFANI E VENTURI - FIRENZE

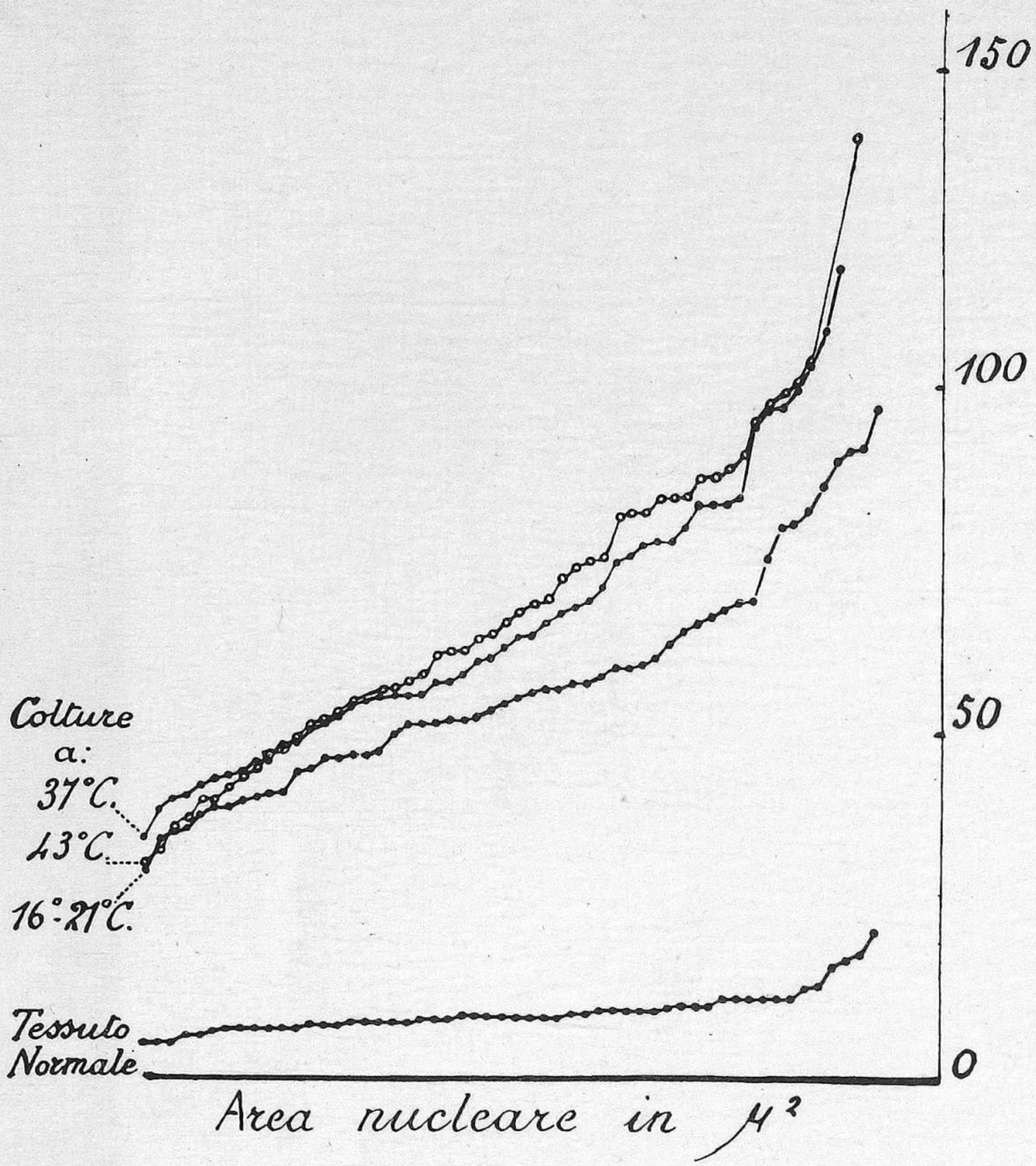
150
100
50
0
Colture a:
37°C.
43°C.
16°-21°C.
Tessuto Normale
Area nucleare in μ²

Grafico 1.

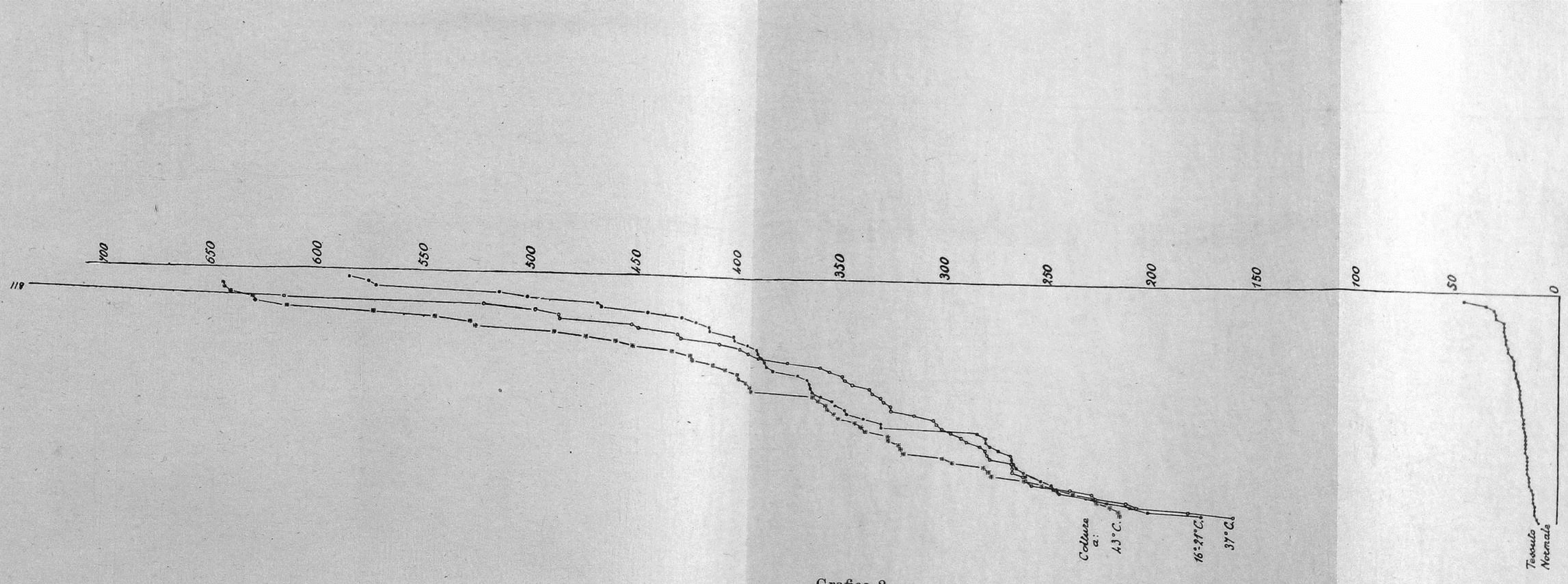
700
650
600
550
500
450
400
350
300
250
200
150
100
50
0
Area del citoplasma in μ²
Tessuto Normale
Colture a: 43°C.
16°-21°C.
37°C.

Grafico 2.

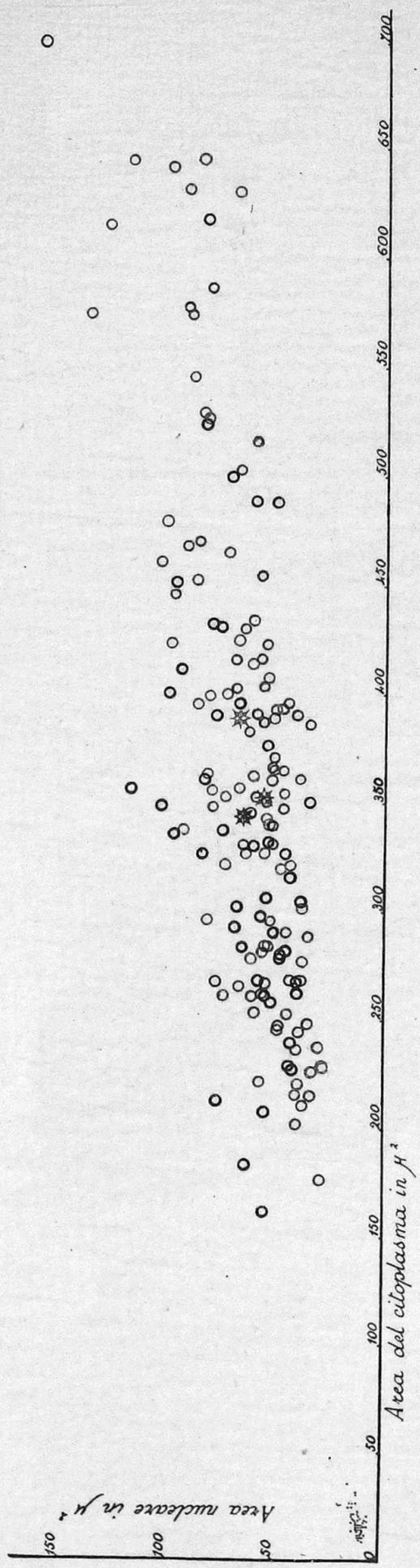
Area nucleare in μ²
0
50
100
150
Area del citoplasma in μ²
50
100
150
200
250
300
350
400
450
500
550
600
650
700

Grafico 3.